



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 44 25 382 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 44 25 382.6
㉔ Anmeldetag: 19. 7. 94
㉕ Offenlegungstag: 25. 1. 96

㉙ Int. Cl.⁶:
A 61 K 39/02
A 61 K 39/112
A 61 K 38/44
C 12 Q 1/26
// (C12N 1/21, C12R
1:42) (C12N 1/21,
C12R 1:19) C12N
15/53

DE 44 25 382 A 1

㉚ Anmelder:
Universität Hohenheim, 70599 Stuttgart, DE

㉛ Vertreter:
Rudolph, U., Dipl.-Biol. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 69198
Schriesheim

㉜ Erfinder:
Beyer, Wolfgang, Dr., 73760 Ostfildern, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

㉞ Nachweisverfahren für bakterielle Lebendvaccinen

㉟ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum diagnostischen Nachweis bakterieller Lebendvaccinen in der Human- und Veterinärmedizin, bei dem der als Lebendimpfstoff geeignete Bakterienstamm mit Luciferase-Genen gentechnisch markiert wird und die Identifizierung des derart markierten Bakterienstamms durch den Nachweis der bakteriellen Lichtproduktion erfolgt.

DE 44 25 382 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 11. 95 508 064/99

8/31

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum diagnostischen Nachweis bakterieller Lebendvaccinen in der Human- und Veterinärmedizin und die Verwendung gentechnisch markierter Bakterienstämme als Lebendvaccine.

Nach dem Stand der Technik ist es bekannt, bakterielle Lebendimpfstoffe zur Immunprophylaxe in der Human- und Veterinärmedizin einzusetzen. Beispiele hierfür sind verschiedene in Deutschland zugelassene Salmonella-Lebendvaccinen, die in der Landwirtschaft zum Schutz der Tierbestände vor Salmonellen angewandt werden.

Eine Grundvoraussetzung für den Einsatz von Lebendvaccinen stellt ihre sichere Nachweisbarkeit und Abgrenzbarkeit vom Wildtyp dar. Gegenwärtig erfolgt die Detektion über den phänotypischen Nachweis der attenuierenden Marker, z. B. Auxotrophien oder Resistenzen. Zusätzliche Markierungen werden bekanntermaßen nicht mehr vorgenommen.

Im Fall von Auxotrophien erfolgt die Prüfung nach selektiver Kultivierung und Reinigung einer Einzelkolonie auf einem Spezialnährmedium (Diagnostikum), auf dem der Impfstamm entsprechend seiner Auxotrophien nicht wachsen darf. Ein solcher Nachweis stellt hohe Anforderungen an die Reinkultur und ist dementsprechend arbeitsaufwendig, langwierig (ca. 2 Wochen bis zur Verdachtsdiagnose) und teuer. Da man häufig mit Mischkulturen von Wildtyp und Impfstamm zu rechnen hat, beispielsweise bei Salmonellen in der Geflügelhaltung, müssen außerdem möglichst viele Einzelkolonien geprüft werden, um eine ausreichend sichere Aussage zum Vorkommen des Impfstammes in einer Salmonella typhimurium-haltigen Probe treffen zu können. Im Fall von Resistenzmarkern müssen in der Routinediagnostik ständig entsprechende Selektivplatten in ausreichender Zahl parallel beimpft und mitkultiviert werden, um den positiven oder negativen Nachweis des Impfstammes zu führen. Da die Auswertung dieser Platten durch resistente Spontanmutanten aus anderen Bakteriengattungen erschwert werden kann, bedarf eine Verdachtskolonie einer weiteren Charakterisierung und Bestätigung als "Salmonella-Impfstamm". Das bedeutet, daß auch hier nur die Einzelkolonie-Reinigung und Charakterisierung die endgültige Diagnose ermöglicht.

Eine Möglichkeit der Bereitstellung bakterieller Lebendimpfstoffe ist die gentechnische Veränderung entsprechender Bakterienstämme. Dabei ist zu beachten, daß ein gentechnisch veränderter Lebendimpfstoff allen Kriterien des deutschen Gentechnikgesetzes genügen muß und gegebenenfalls entsprechenden internationalen Anforderungen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Nachweisverfahren für bakterielle Lebendvaccinen bereitzustellen, bei dem Zeit-, Material- und Kostenaufwand drastisch reduziert sind.

Eine Lösung dieser Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens der eingangs genannten Art, bei dem der als Lebendimpfstoff geeignete Bakterienstamm mit Luciferase-Genen gentechnisch markiert wird, und die Identifizierung des derart markierten Bakterienstamms durch den Nachweis der bakteriellen Lichtproduktion erfolgt.

Das erfindungsgemäße Verfahren bietet überraschend viele Vorteile: Es ermöglicht eine schnelle, einfache und sichere — weil "positive" — Identifikation des Impfstammes bereits nach dem ersten Kultivierungs-

schrift. Bakterien-Reinkulturen sind nicht mehr erforderlich. Die markierten Bakterien sind aufgrund ihrer Lichtproduktion mit bloßem Auge auf jeder routinemäßig angelegten Selektionsplatte nachweisbar. Der Befund "Impfstamm" erfolgt gleichzeitig mit dem bakteriologischen Befund "Salmonellae" nach 34 Tagen Arbeitsaufwand. Ein zusätzliches Diagnostikum ist nicht notwendig. Die bakteriologische Routinediagnostik auf Salmonellen in den Untersuchungsämtern muß weder methodisch noch apparativ verändert werden. Auch die bisher bestehende Notwendigkeit einer Bestätigung des Testergebnisses durch den Impfstamm-Hersteller entfällt.

Das lux-System eignet sich besonders deshalb als Nachweismittel, weil

- dieses System unter natürlichen Bedingungen ein selten vorkommendes Ereignis ist (d. h. es treten keine background-Effekte auf),
- die Messung von Licht schnell und sensitiv und der Einsatz von Luminometern eine gut etablierte, preiswerte Technik ist, und
- der Nachweis einer luminiszierenden Kultur auf einem Nährboden mit bloßem Auge möglich ist.

Die gentechnische Markierung kann sowohl mit eukaryontischen als auch mit prokaryontischen Luciferas-Genen durchgeführt werden.

Bei einer bevorzugten Variante der Erfindung erfolgt die gentechnische Markierung mit Luciferas-Genen durch Rekombination eines lux-Operons von *Vibrio fischeri* und/oder *Vibrio harveyi* und/oder *Photobacterium phosphoreum* und/oder *Photobacterium leiognathi* und/oder *Xenorhabdus luminescens* in das Bakteriengenom.

Die bakterielle Lichtproduktion wird vorzugsweise mit Hilfe von Photometer(n), insbesondere Luminometer(n) nachgewiesen.

Das zur Rekombination verwendete lux-Operon kann auf gentechnischem Weg durch Klonierung oder auch durch chemische Synthese bereitgestellt werden.

In einer besonders bevorzugten Verfahrensvariante wird das lux-Operon in dem Vektor pMMB 190, ATCC 37807, vorzugsweise am Restriktionsort Sall, oder in dem Vektor pMMB 207, vorzugsweise am Restriktionsort BamHI-Sall, ligiert, in dem Bakterium *Escherichia coli*, vorzugsweise Stamm *E. coli* K12, kloniert und mit Hilfe des Plasmids pRK, ATCC 37159 oder eines anderen Hilfsvektors in die als Lebendvaccine geeignete(n) Bakterienzelle(n) transferiert.

Bei einer anderen Verfahrensvariante wird das lux-Operon durch homologe Rekombination in das Impfstamm-Chromosom eingebaut.

Ebensogut kann der Einbau in das Impfstamm-Chromosom mittels eines Transposon Vektors oder mittels eines Phagen erfolgen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sind die verschiedensten bakteriellen Lebendvaccinen markierbar und über ihre Lichtproduktion nachweisbar.

Eine besonders einfache zu gewinnende bakterielle Lebendvaccine zeichnet sich dadurch aus, daß das Bakteriengenom ein rekombiniertes lux-Operon enthält, das vorzugsweise aus *Vibrio fischeri* und/oder *Vibrio harveyi* und/oder *Photobacterium phosphoreum* und/oder *Photobacterium leiognathi* und/oder *Xenorhabdus luminescens* stammt.

Ein zur Bekämpfung der Salmonellose besonders geeigneter Lebendimpfstoff wird mit dem *Salmonella ty-*

phimurium-Bakterienstamm bereitgestellt, der dadurch gekennzeichnet ist, daß das Bakteriengenom rekombinierte Luciferase-Gene enthält, die dem Bakterienstamm die Eigenschaft der bakteriellen Lichtproduktion geben und damit die Lebendvaccine vom Wildtyp optisch unterscheidbar machen.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Zur Bekämpfung von Salmonellose bei Hühnern und Tauben sind in Deutschland die Lebendimpfstoffe *Salmonella typhimurium* (Zoosaloral H^R, Deutsches Tierärzteblatt, Dez. 1992; Zoosaloral T, DT, Februar, 1993) und *Salmonella typhimurium* (TAD *Salmonella vac*^RT) zugelassen. Der Nachweis von *Salmonella typhimurium* (Zoosaloral HR) erfolgt bisher anhand der stammeigenen Auxotrophien, der von *Salmonella typhimurium* (TAD *Salmonella vac*^RT) anhand der stammspezifischen Resistenzen.

In beide Impfstämme wurde das lux-Operon aus *Vibrio fischeri* wie im folgenden beschrieben rekombiniert.

Die Methodik der Klonierung des lux-Operons aus *Vibrio fischeri* sowie die Charakterisierung der Gene gehört zum Stand der Technik. Bereits 1982 wurde ein lux-Operon aus *Vibrio harveyi* isoliert und in *E. coli* kloniert (Belas et al., 1982, Bacterial bioluminescence: isolation and expression of the luciferase genes from *Vibrio harveyi*. Science 128, 791—793). Weitere lux-Operon-Isolierungen sind für *Photobacterium phosphoreum*, *Photobacterium leiognathi* und *Xenorhabdus luminescens* beschrieben (zur Übersicht siehe Meighen, 1991, Molecular Biology of Bacterial Bioluminescence. Microbiol. Rev. 55, 123—142).

Ein ca. 9 kb Sall-Fragment mit dem kompletten lux-Operon aus *Vibrio fischeri* wird mit den bekannten Methoden in den Sall-Ort des Plasmids pMMB 190, ATCC 37807, ligiert und in *E. coli* K12 kloniert. Die Selektion erfolgt auf Ap-Resistenz und "Leuchten". Die Übertragung des Konstrukts auf den einen bzw. anderen Impfstamm erfolgt durch ein triparentales Mating mit dem Helferplasmid pRK, 2013 ATCC 37159. Die Isolierung leuchtender Salmonellen erfolgt für

- den *Salmonella typhimurium* Impfstamm (Zoosaloral H^R) nach Revitalisierung in Peptonwasser und zweimaliger Selektivanreicherung in RVS auf antibiotikahaltigen Selektivagarplatten (XLD, BPLA mit Ampicillin),
- den *Salmonella typhimurium* — Impfstamm TAD *Salmonella vac*^RT nach Kultivierung auf antibiotikahaltigen Selektivagarplatten (XLD mit Rifampicin, Nalidixinsäure und Ampicillin).

Leuchtende Kolonien sind mit bloßem Auge in der Dunkelkammer leicht zu identifizieren.

Beispiel 2

Zur Markierung der beiden Impfstämme *Salmonella typhimurium* (Zoosaloral H^R) und *Salmonella typhimurium* (TAD *Salmonella vac*^RT) wird ein promotorloses BglII-Sall-Fragment aus dem lux-Operon von *Vibrio fischeri* in das Plasmid pMMB 207, ATCC 37809, BamHI-Sall ligiert. In diesem Konstrukt stehen die Gene luxAB unter der Kontrolle des tac-Promotors von pMMB 207.

Der Promotor ist IPTG-induzierbar. Aufgrund des Fehlens von luxC und eines Teils von luxD ist für die bakterielle Lichtproduktion die exogene Zugabe eines Aldehyds notwendig.

Die Übertragung des rekombinierten Plasmids in einen der beiden Vaccine-Stämme erfolgt wie in Beispiel 1 beschrieben.

Zur Induzierung der Lichtproduktion wird IPTO (0,2—0,4 mM) und Aldehyd (10%ige Nonanal-, Decanal- oder Dodecanal-Lösung) zum Medium gegeben. Aufgrund der besonders intensiven Lichtproduktion ist Nonanal als Substrat bevorzugt. Schon innerhalb weniger Sekunden nach der Substratzugabe können die Kolonien in der Dunkelkammer eindeutig identifiziert werden.

Sowohl die gemäß Beispiel 1 als auch die gemäß Beispiel 2 markierten Lebendimpfstoffe sind in routinemäßig auf Salmonellen zu untersuchenden Hühner- bzw. Tauben-Kotproben eindeutig zu identifizieren.

Eine Überprüfung der Stabilität der rekombinanten Plasmide in Form einer 10-maligen Subkultivierung im Flüssigmedium ohne Antibiotikazusatz ergab einen Plasmidverlust in 8 von 2500 Kolonien (0,3%).

Patentansprüche

1. Verfahren zum diagnostischen Nachweis bakterieller Lebendvaccinen in der Human- und Veterinärmedizin, dadurch gekennzeichnet, daß der als Lebendimpfstoff geeignete Bakterienstamm mit Luciferase-Genen gentechnisch markiert wird, und daß die Identifizierung des derart markierten Bakterienstamms durch den Nachweis der bakteriellen Lichtproduktion erfolgt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Markierung mit eukaryontischen Luciferase-Genen erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Markierung mit prokaryontischen Luciferase-Genen erfolgt.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Markierung mit Luciferase-Genen durch Rekombination eines lux-Operons von *Vibrio fischeri* und/oder *Vibrio harveyi* und/oder *Photobacterium phosphoreum* und/oder *Photobacterium leiognathi* und/oder *Xenorhabdus luminescens* in das Bakteriengenom erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis der bakteriellen Lichtproduktion mit Hilfe von Photometer(n), insbesondere Luminometer(n) erfolgt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das zur Rekombination verwendete lux-Operon kloniert ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß das zur Rekombination verwendete lux-Operon chemisch synthetisiert ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das lux-Operon in dem Vektor pMMB 190 ATCC 37807 oder dem Vektor pMMB 207 ATCC 37809 ligiert ist, daß die Klonierung dieses Vektors in dem Bakterium *Escherichia coli*, vorzugsweise Stamm *E. coli* K12, erfolgt, und daß der Transfer des lux-Operon-haltigen Vektors aus *E. coli* in die als Lebendvaccine geeignete(n) Bakterienzelle(n) mittels des Plasmids

pRK 2013 ATCC 37159 oder eines anderen Hilfsvektors erfolgt.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau des lux-Operons in das Impfstamm-Chromosom durch homologe Rekombination erfolgt. 5

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau des lux-Operons in das Impfstamm-Chromosom mittels eines Transposon Vektors erfolgt. 10

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Einbau des lux-Operons in das Impfstamm-Chromosom mittels eines Phagens erfolgt.

12. Bakterielle Lebendvaccine, dadurch gekennzeichnet, daß sie nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1 hergestellt ist. 15

13. Bakterielle Lebendvaccine, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakteriengenom rekombinierte Luciferase-Gene enthält, die dem Bakterienstamm die Eigenschaft der bakteriellen Lichtproduktion geben und damit die Lebendvaccine vom Wildtyp optisch unterscheidbar machen. 20

14. Bakterielle Lebendvaccine nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakteriengenom ein rekombiniertes lux-Operon, vorzugsweise aus *Vibrio fischeri* und/oder *Vibrio harveyi* und/oder *Photobacterium phosphoreum* und/oder *Photobacterium leiognathi* und/oder *Xenorhabdus luminescens* enthält. 25 30

15. *Salmonella* spp. — Bakterienstamm, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakteriengenom rekombinierte Luciferase-Gene enthält, die dem Bakterienstamm die Eigenschaft der bakteriellen Lichtproduktion geben und damit die Lebendvaccine vom Wildtyp optisch unterscheidbar machen. 35

16. Verwendung eines *Salmonella* spp. — Bakterienstamms nach Anspruch 15 als Lebendimpfstoff, vorzugsweise für Vögel, insbesondere für Hühner und Tauben. 40

17. *Salmonella typhimurium* — Bakterienstamm, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakteriengenom rekombinierte Luciferase-Gene enthält, die dem Bakterienstamm die Eigenschaft der bakteriellen Lichtproduktion geben und damit die Lebendvaccine vom Wildtyp optisch unterscheidbar machen. 45

18. Verwendung eines *Salmonella typhimurium* — Bakterienstamms nach Anspruch 17 als Lebendimpfstoffe vorzugsweise für Vögel, insbesondere für Hühner und Tauben. 50

55

60

65